



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STUDIUM PRODUKCE BAKTERIÁLNÍ CELULÓZY ZA
VYUŽITÍ HROZNOVÝCH VÝLISKŮ JAKO UHLÍKOVÉHO
ZDROJE**

EVALUATION OF GRAPE POMACE AS CARBON SOURCE FOR BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Radim Stříž

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1423/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Radim Stříž**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium produkce bakteriální celulózy za využití hroznových výlisků jako uhlíkového zdroje

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma.
2. Porovnání dvou metod pro stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho–Nelsona (NS) a pomocí dinitrosalicylové kyseliny (DNS).
3. Studium produkce bakteriální celulózy pomocí bakterie *Gluconacetobacter xylinus*.
4. Porovnání produkce bakteriální celulózy v závislosti od podmínek produkce (typ míchaní, pH, uhlíkový zdroj).
5. Vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a závěr práce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Radim Stříž
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem produkce bakteriální celulózy pomocí bakterie *Gluconacetobacter xylinus*. Obsahem teoretické části je stručná charakterizace *G. xylinus*, vlastností a využití bakteriální celulózy v současnosti.

V experimentální části byla provedena optimalizace produkce bakteriální celulózy pomocí *G. xylinus* CCM 3611. Tato optimalizace se týkala hlavně pH, typu kultivace a použitého cukru jako zdroje uhlíku pro produkci. Touto optimalizací byly stanoveny nejlepší podmínky pro produkci bakteriální celulózy, konkrétně se jedná o pH 6,5. Jako nejlepší sacharid pro dynamickou produkci byla zjištěna manóza, hmotnost tohoto produktu byla 1156 mg na 100 ml produkčního média při koncentraci manózy 20 g/l. Molekulová hmotnost tohoto produktu pak byla 426,1 kg/mol. Pro statickou kultivaci byla jako nejlepší sacharid určena sacharóza. Nejvyšší výtěžek činil 1555 mg na 100 ml produkčního média při koncentraci sacharózy 20 g/l. Molekulová hmotnost tohoto produktu byla 441,9 kg/mol.

Dále bylo provedeno srovnání dvou metod pro stanovení redukujících sacharidů – konkrétně metod dle Somogyi-Nelsona a metody s využitím dinitrosalicylové kyseliny. Z tohoto srovnání bylo zjištěno, že lepší pro stanovení je metoda Somogyi-Nelsona, která poskytovala sice nadhodnocené výsledky, ale oproti metodě DNS se jednalo o menší nadhodnocení. Nejlepší metodou je stále použití HPLC, ale pokud je třeba rychlého stanovení lze využít metodu SN.

U vybraných vzorků byla zjištěna molekulová hmotnost. Ta se lišila v závislosti na použitém zdroji uhlíku.

Závěrem možno konstatovat, že v moravském regionu je velká produkce vinařské biomasy. Proto se využití extraktu z hroznových výlisků jako zdroje uhlíku pro produkci bakteriální celulózy jeví zajímavě, hlavně z hlediska recirkulační ekonomiky. Výsledky ukázaly, že tento extrakt může být použit, a dokonce získáme vyšší výtěžek než v případě směsi industriálních cukrů.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on the production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. The theoretical part consists of a brief description of *G. xylinus*, properties and uses of bacterial cellulose.

Firstly, the experimental part focuses on optimization of production of bacterial cellulose by *G. xylinus* CCM 4611. This optimization was focused on pH value, a cultivation type, and used carbon source for production. The optimal pH was 6.5. The carbon source showing the highest production of bacterial cellulose was mannose for the dynamic production and saccharose for the static production of bacterial cellulose.

The second part of the experimental part focuses on a comparison of two methods for assaying reducing sugars – Somogyi-Nelson (SN) assay and dinitrosalicylic acid (DNS) assay. The comparison of two above mentioned methods showed that the results obtained by the SN method were very close to High performance liquid chromatography (HPLC) data. It can be concluded that HPLC method is the best method if we need to know the type of sugars but if we need only the quick determination of the sum of the reduction sugars, SN method is very suitable.

It can be concluded that the Moravian region produces a large amount of winery biomass. Therefore, the use of the pomace extract as a carbon source for the production of bacterial cellulose seems to be interesting mainly from the point of the recirculation economy. The obtained results showed that the grape sugar extract could be used, and from the production values, it is even more suitable for the production of bacterial cellulose than industrial sugars.

KLÍČOVÁ SLOVA

Gluconacetobacter xylinus, bakteriální celulóza, metoda Somogyi-Nelsona, metoda dinitrosalicylové kyseliny, optimalizace produkce

KEY WORDS

Gluonacetobacter xylinus, bacterial cellulose, Somogyi-Nelson assay, DNS assay, production optimization

STŘÍŽ, Radim. *Studium produkce bakteriální celulózy za využití hroznových výlisků jako uhlíkového zdroje* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-24]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113501>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své vedoucí bakalářské práce, doc. Ing. Adriáně Kovalčík, PhD., za odborné vedení, pomoc, ochotu, cenné rady a trpělivost v průběhu práce na této bakalářské práci. Dále děkuji Ing. Michalovi Machovskému, Ph.D (Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně) za snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu. Dále děkuji prof. Falku Liebnrovi a Irině Sulaevě (Institute for Chemistry of Renewable Resources, University of Natural Resources and Life Sciences Vienna, Rakousko) za změření molekulové hmotnosti produktů.

Tato práce byla podpořená projektem SoMoPro (projekt č. 6SA18032). Projekt získal finanční prostředky z programu pro výzkum a inovace Horizont 2020 Evropské unie v rámci akcí Marie Skłodowska-Curie a je spolufinancován Jihomoravským krajem dle grantové dohody č. 665860. Dále byla práce podpořená projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy projekt č. 8J19AT030. Poznámka: Tento materiál odráží pouze postoje autora a EU není zodpovědná za jakékoli použití prezentovaných informací.



OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	3
1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Rod <i>Acetobacter</i>	8
2.2 Celulóza.....	8
2.2.1 Bakteriální celulóza (BC)	9
2.2.2 Využití bakteriální celulózy	10
2.3 Použité analytické metody.....	13
2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	13
2.3.2 Absorpční spektrofotometrie	13
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
3.1 Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy	14
3.2 Použité metody	15
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	20
4.1 Porovnání dvou spektrofotometrických metod pro detekci redukujících cukrů ve vzorku extraktu z hroznových výlisků.....	20
4.2 Charakterizace extraktu z hroznových výlisků.....	21
4.3 Optimalizace produkce bakteriální celulózy	21
4.4 Charakterizace morfologie vybraných vzorků bakteriální celulózy	24
4.5 Charakterizace produktu zjištěním molekulové hmotnosti bakteriální celulózy.....	25
5 ZÁVĚR.....	26
6 ZDROJE	27
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	30
7 PŘÍLOHY	31

1 ÚVOD

Biotechnologie je oblast vědy, která využívá práci mikroorganismů místo lidí. Tato oblast je velmi rozšířená a zahrnuje potravinářský, farmaceutický nebo těžební průmysl, ale také zemědělství.

Ve farmaceutickém průmyslu jsou tedy některé léky a účinné látky syntetizovány pomocí vhodných mikroorganismů. Tato syntéza je často díky optimalizaci produkčních podmínek levnější než klasická chemická syntéza. Dále také často zanechává menší odpadovou stopu. Nevýhodou biotechnologických metod je vysoká cena vstupních surovin, produkce a izolace produktů.

Jedním ze způsobů, kterými došlo ke snížení nákladů takovéto produkce, je také využití potravinářských odpadů jako např. uhlíkových nebo dusíkatých zdrojů pro produkci různých látek mikroorganismy. Každý mikroorganismus je vybaven širokou škálou enzymů, díky kterým mohou tento odpad využívat jako zdroj uhlíku, dusíku nebo jiných potřebných látek pro růst. Během růstu mikroorganismy zároveň produkují metabolity, které můžeme dále využít. Mezi tyto metabolity patří například polyhydroxyalkanoáty nebo bakteriální celulóza.

Například oblast jižní Moravy je známá svými vinicemi. Celková plocha vinic ve Vínarské oblasti Morava je asi 18 500 hektarů. Pro výrobu vína je však potřeba jen dužina. Zbylé části plodu hroznů jsou tedy nevyužity a zůstávají jako odpad, zvaný matoliny. Přitom slupka a vylisovaná dužina jsou tvořeny hlavně polysacharidy, které mohou být hydrolyzovány a dále využity jako zdroj uhlíku pro mikroorganismy. Dalším zbylým materiálem jsou zrníčka, ze kterých je možné vylisovat olej (přibližně 50 kg oleje z 2 tun hroznů), a ze zbylého materiálu se dají vyizolovat polyfenoly, lignin a také cukry. Bohužel jen málo vinařů lisuje olej a velká část matolin je zaorávána na vinicích jako hnojivo.

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací podmínek pro produkci bakteriální celulózy bakterií *Gluconacetobacter xylinus* s využitím odpadního materiálu, konkrétně hroznových výlisků jako zdroje uhlíku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rod *Acetobacter*

Tento rod tvoří Gram-negativní, aerobní bakterie, které jsou schopny produkovat kyselinu octovou. [1]

Produkce celulózy, za kterou je zodpovědný *Gluconacetobacter xylinus* (další používané názvy: *Komagataeibacter xylinum*, *Acetobacter xylinus*), bývá využívána jako modelový systém pro studium biochemické a genetické podstaty této syntézy. Rychlost produkce celulózy je přímo úměrná rychlosti buněčného růstu a její podíl závisí na použitém zdroji uhlíku. Vyprodukovaná celulóza je velmi čistá a bez příměsí. Díky tomu je její využití velmi rozšířené v mnoha odvětvích. Pro izolaci jsou používány dvě metody – mechanická separace nebo izolace s použitím alkalického prostředí, kdy dochází k odstranění bakteriálních buněk. [1]

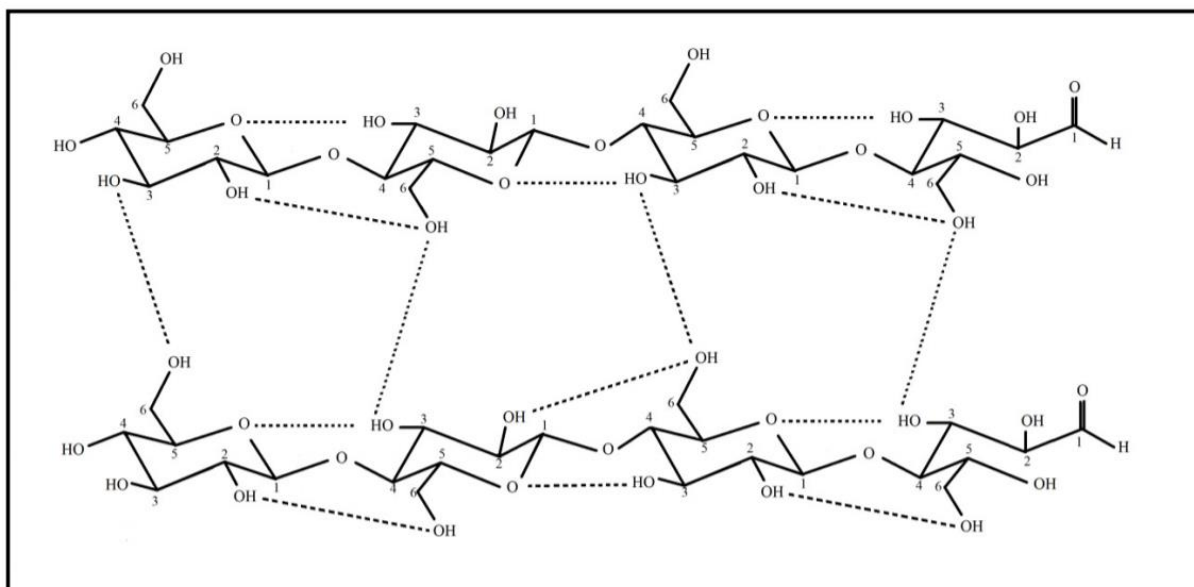
Gluconacetobacter xylinus vylučuje dlouhé β -1,4-glukanové řetězce o průměru 1,5 nanometru z pórů umístěných podél podélné osy buňky. Tyto řetězce se poté agregují na 3-4 nm silné mikrofibrily krystalizací s dalšími vlákny v médiu. Za syntézu těchto glukanů zodpovídá membránově vázaný protein – cellulose-syntáza. [2]

2.2 Celulóza

Jedná se o nejrozšířenější a levný uhlovodíkový polymer na světě, který se tradičně získává z rostlin nebo jejich zbytků. Standardně se větví a tato větvení jsou tvořena hemicelulózami a ligninem. Obecná struktura celulózy se nachází na obrázku 1. To způsobuje vysoké požadavky na čištění a velmi vysoké ceny čištění. Jedná se však o materiál, jehož využití se dostává do popředí jako náhrada plastů. V přírodě existují bakterie, které jsou schopny tento materiál rozložit narozdíl od dlouhé rozkládací doby plastů. Proto se hledají cesty, jak tento proces čištění zlevnit nebo se mu vyhnout. [2]

Řešením tohoto problému je právě využití bakteriální celulózy (BC), která se skládá pouze z glukózového monomeru. Tím pádem odpadávají drahé a náročné procesy na čištění a odstranění postranních řetězců. Tato nanostruktura je naprosto unikátní (je schopna zadržet velká množství vody) a vykazuje velkou mechanickou odolnost a vysoký stupeň polymerace. Díky těmto vlastnostem se jedná o velký příslib do budoucna. [2]

Pro produkci bakteriální celulózy využívají oxidativní fermentaci. Jsou schopny růstu na syntetických i minerálních médiích. *Acetobacter xylinum* je pozorován jako nejúčinnější producent BC, který je schopen utilizací různých monosacharidů v médiu a poměrně vysokých výtěžků BC. Tato bakterie aktivně fermentovala v rozmezí pH 3-7 a rozmezí teplot 25-30 °C. Bohužel vysoká cena a nízká produkce brání použití ve větším průmyslovém měřítku. [2]

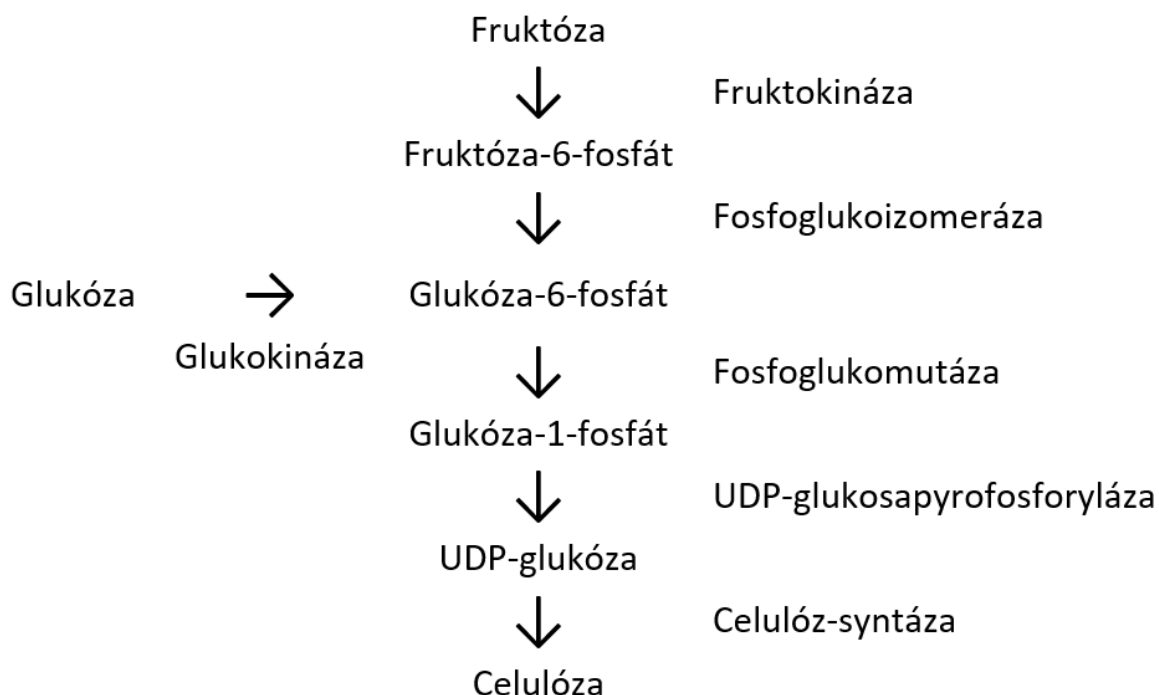


Obrázek 1 – Struktura celulózy [2]

2.2.1 Bakteriální celulóza (BC)

Základní vláknitá struktura je tvořena β -1,4-glukanovými řetězci. Tyto řetězce jsou spojeny pomocí vodíkových můstků. Tak dojde k vytvoření 3D struktury, která je při správně zvoleném způsobu produkce ve formě hydrogelové vrstvy. Během syntézy jsou produkovány protofibrily, které spolu agregují a tvoří nanofibrilová vlákna. Tato vlákna poté utvoří síťovou strukturu, která je vysoce porózní. Na povrchu se nachází velké množství hydroxylových skupin. Tím lze vysvětlit její vysokou hydrofilitu, biodegradabilitu a možnosti chemických modifikací. [2]

BC je produkována pomocí celulózu syntetizujících enzymů. Tato dráha je naznačena na obrázku 2. Ty používají jako výchozí látku UDP-glukózu. Ta je syntetizována postupně z glukóza-6-fosfátu. Ten je pomocí fosfoglukomutázy převeden na glukóza-1-fosfát, který je následně pomocí UDP-glukopyrofosforylázy převeden právě na UDP-glukózu. Pokud je jako substrát použita glukóza, bakterie ji přemění na glukózu-6-fosfát s využitím enzymu zvaném hexokináza. [3]



Obrázek 2 – Biochemická syntetická dráha celulózy [4]

2.2.2 Využití bakteriální celulózy

Díky svým vlastnostem je využití BC možné v široké škále odvětví, např. v oblasti chirurgické medicíny, farmacie, kosmetiky, papírenského, potravinářského a také oděvního průmyslu. V současnosti je produkce studována i na jiných mikroorganismech, konkrétně *Gluconobacter hansenii* na výluhu z kukuřice. [5] Produkce s využitím *G. xylinus* je zkoumána s odpadní vodou jako zdrojem živin. [6]

Medicína a farmacie

Nanostruktura bakteriální celulózy je velmi podobná kolagenu. Obě tyto látky jsou často primární mechanickou podporou pro tkáň. V medicínských aplikacích se tedy používá stejně jako kolagen například na buněčné matrice. Výhodou BC je však její biokompatibilita. Kolagen je protein, tělo jej tedy pozná a imunologicky na něj reaguje. BC je však polysacharid. Polysacharidy mají výrazně nižší imunologickou odpověď. [7]

Jedním z příkladů takového využití BC je náhrada cév. Z BC je připravena trojrozměrná matrice, na které poté mohou buňky lépe růst a vytvořit náhradu za ucpanou cévu. Matrice je připravena například růstem BC na rozvětvené silikonové trubici, aby vznikl požadovaný tvar (Obrázek 3). Tato možnost zatím byla testována na zvířatech. Studie, která se tímto problémem zabývala, došla k závěru, že BC je možno využívat jako biomateriál, ale jsou potřeba další specializované testy. Testy, které již byly provedeny, ale odhalily, že BC je vysoce odolná vůči vodě nebo iontům. [8]



Obrázek 3 – Připravená náhrada cévy [9]

Dále se také využívá jako krycí materiál na rány a popáleniny, případně vředy. Jde o biokompatibilní, sterilní, flexibilní a porózní materiál, který dovoluje zraněním dýchat a zároveň blokuje tvorbu jizev. Dále také snižuje bolest, nedochází přes něj ke ztrátě tělních tekutin a poskytují ochranu před infekcí. [10]

Díky své schopnosti nasát až 100násobek své váhy ve vodě, dochází k používání BC jako nosiče léků. Jde hlavně o přenos přes pokožku, kde se využívá možnosti ji vytvarovat na základě cílového místa. Také dochází k pozvolnému uvolňování účinné látky, což umožňuje přesné dávkování. Nicméně testy ukázaly, že využití BC je vhodné hlavně pro postupně uvolňované léky. V testech bylo zjištěno, že pro krátkodobý účinek jsou na stejné úrovni jako v současné době používané metody. [11]

V medicíně je také používán kompozit BC a hydroxyapatitu. Tento kompozit byl studován jako pomocný prvek pro rychlejší obnovu kostí, například po zlomenině. Poměr vápníku a fosforu v připravených membránách BC-HA se téměř shoduje s poměrem v kostech. Navíc se ukázalo, že tento kompozit zůstává v postiženém místě déle. Jeho reabsorpce je velmi pomalá. [12]

Další využití ve farmacii je při výrobě tablet, kdy se BC využívá jako pojivo s vlastnostmi vlákniny. Tím pádem dochází ke stimulaci střeva, posílení jeho peristaltik, stabilizaci aktivity střevní mikroflóry, podpoře uvolňování cholesterolu nebo zabránění absorpce sterolu. Navíc je možné ji využít jako výživový prostředek, kdy do sebe vsákne živiny, které postupně uvolní do těla. [10]

Kosmetika

Někteří vědci studovali využití BC v kosmetice. Došli k závěru, že používáním obličejové masky z BC je možné dosáhnout zpevnění obličeje. To bylo způsobeno právě vysokým obsahem vody a jejím přestupem do obličeje. Navíc nezapáchá a dobře přiléhá k obličeji. [13]

Papírenský průmysl

Díky kompatibilitě s rostlinnou celulózu a schopnosti bakterií vyprodukovat BC na povrchu papíru byl proveden experiment, zda je možné posílit papír pomocí BC. Povedlo se jim vytvořit ochrannou vrstvu na povrchu papíru, který byl použit jako podklad pro růst. Proto se uvažuje o možnosti využít

BC pro prodloužení životnosti papíru a možnosti tímto způsobem zachránit staré dokumenty z dávných dob. Navíc by se povrch papíru stal hydrofobním. [14]

Potravinářský průmysl

Velmi rozšířené využití má zejména v jihovýchodní Asii. Pomocí *Komagataeibacter xylinus* (jiný název pro *Gluconacetobacter xylinus*) je připravena hmota z kokosové vody, která se dále používá jako ztužovač, případně se samotná konzumuje díky své nasládlé chuti v dezertech nebo salátech. Na Filipínách se používá do pudinku nebo želé. Dále se využívá v Japonsku v čaji kombucha.

Byla také provedena studie s použitím BC v různých potravinách. Například u čokoládového nápoje došlo přidáním BC ke zvýšení viskozity. BC také díky své porézní struktuře zabraňovala srážení kakaa na dně kelímku. Navíc si tuto vlastnost zachovala i při zahřívání, na rozdíl od xanthanu. Při jeho použití se velká část kakaa vysrážela na dně. [15]

Zajímavá studie byla provedena i se zmrzlinou. BC byla použita místo jiných stabilizátorů. U stabilizátorů došlo k rozpuštění po 60 minutách, zatímco při použití BC zmrzlina i po 60 minutách stále držela svůj tvar. [15]

Dalším využitím je náhrada masa. Pokud BC absorbuje roztok s hovězím extraktem, lze vzniklý materiál přidat například do párků nebo hamburgerů. Tím dojde ke snížení energetické hodnoty až o 25 %. Tento produkt poté splňuje klasifikaci pro nízkokalorické jídlo. Je ovšem otázkou, zda je tato cesta správná. Pokud se jedná o klasického zákazníka, ten snížení obsahu masa příliš neocení. Tato vlastnost BC bude spíše využita pro různé vegetariánské náhražky. [15]

Oděvní průmysl

Pracuje se také na výrobě oděvů z BC. Jedná se například o šaty, boty a trička. Touto oblastí se zabývá například Slovenka Zuzana Gombošová, která žije v Indii. Vystudovala obor módní návrhářství, ale při přípravě kolekce si začala všimnout, kolik látky vůbec nevyužije a zahodí. Z toho důvodu začala hledat materiál, který by byl snadno udržovatelný a biodegradabilní. Při své cestě do Indie narazila právě na BC. Se svým manželem poté navrhla a sestavila přístroj, který dokáže BC přeměnit přímo na požadovanou látku. Díky své schopnosti BC je možné ji obarvit a následně využít právě na různé kusy oděvů. Zatím se soustředí na výrobu oděvů, které nejsou ve styku s kůží, například kabáty. Také však již vyrobila kabelky. [16]

Kompozity obsahující BC

Jde o využití buď jako matrixu nebo výplně. Zatím byla BC využita spolu s anorganickými látkami, kdy došlo k zachování nejlepších vlastností BC a jejich kombinaci s anorganickými látkami. Vlastnosti, kterých bylo docíleno, se využívají při výrobě optických, magneticky senzitivních disků, zkapalnění toxického odpadu nebo flexibilního materiálu pro ukládání dat. [10], [17], [18]

První využití v audiotechnice byla sluchátka od firmy Sony. Takto vyprodukovaná celulóza je přibližně stejně pevná jako hliník, ale zároveň dostatečně lehká pro minimalizaci zkreslení zvuku. [10]

2.3 Použité analytické metody

2.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je chromatografická separační metoda založená na rozdílné distribuci složek mezi stacionární a kapalnou mobilní fází [19]. Tato separace může být založena na adsorpci (adsorpční chromatografie), rozdělení (rozdělovací chromatografie), síťovém efektu (gelová permeační chromatografie), výměně iontů (iontoměničová chromatografie), specifické interakci (afinitní chromatografie) nebo na interakci hydrofilních skupin. Mobilní fází je kapalina, stacionární fázi tvoří velmi malé částice (3-10 μm) s úzkou distribucí velikosti. Nejčastěji je tvořena modifikovaným silikagelem, organickými polymery nebo oxidy kovů. [19] Využitím této metody lze dosáhnout rychlé separace složitých směsí látek s vysokým rozlišením zón. [20]

Základními komponentami HPLC systému jsou:

- Čerpadlo zajišťující stálý průtok mobilní fáze,
 - Směšovací zařízení sloužící k úpravě složení mobilní fáze,
 - Dávkovací zařízení umožňující vnesení vzorku do toku mobilní fáze,
 - Předkolona a kolona, kde dochází k vlastnímu dělení složek směsi na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi,
 - Detektor sloužící k převodu analyzované vlastnosti dané látky na elektrický signál,
 - Vyhodnocovací zařízení zpracovávající informace z detektoru a vykresluje chromatogram.
- [19]

Výstupem této metody je chromatogram, který zobrazuje závislost intenzity signálu z detektoru na čase. Identitu analyzovaných látek lze určit pomocí hodnoty retenčního času (čas od nástřiku po dosažení maxima píku) a srovnáním této hodnoty se standardem. Množství analytu je poté určeno s pomocí kalibračních křivek tvořených z ploch píků. [19]

2.3.2 Absorpční spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrie je založena na schopnosti molekul vzorku pohlcovat část záření. Jako zdroj bývají využívány deuteriové a vodíkové výbojky pro UV a wolframové a halogenové žárovky pro VIS oblast [19]. Paprsek světla o známé intenzitě a vlnové délce prochází kyvetou se vzorkem, kde se část záření pohltí. Množství absorbovaného záření vyhodnotí detektor. [20]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy

Použité chemikálie pro přípravu médií

Kvasničný extrakt, HiMedia Laboratories, Indie
Agar, HiMedia Laboratories, Indie
Pepton bakteriální, HiMedia Laboratories, Indie
D-glukosa monohydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
D-fruktosa, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
D-galaktosa, DAB G, Lachema Česká republika
D-mannosa, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
D-sacharosa, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Uhlíčan vápenatý srážený, čistý, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina citronová, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina octová, 98%, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

Použité chemikálie pro stanovení obsahu redukujících cukrů

Dinitrosalicylová kyselina, Sigma Aldrich, SRN
Uhlíčan sodný bezvodý, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenuhlíčan sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Síran sodný bezvodý, Lach-Ner s.r.o., Česká republika
Vínan sodno-draselný, Lachema, Česká republika
Síran měďnatý heptahydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Molybdenan amonný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát, Lachema, Česká republika

Použité chemikálie pro stanovení polyfenolů a flavonoidů

Folin-Ciocaltevo činidlo, p.a., Penta, Česká republika
Uhlíčan sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina gallová, Sigma Aldrich, SRN
Chlorid hlinitý, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Dusitan sodný, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Katechin, Sigma Aldrich, SRN

Použité chemikálie pro stanovení kyselosti a vitamínu C

Kyselina askorbová
2,6-dichlorfenolindofenol
Monohydrogenfosforečná kyselina
Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina šťavelová dihydrát
Formaldehyd

Laboratorní přístroje a pomůcky

Sestava pro HPLC (pumpa LCP 4020, termostat LCO 101, odplynovač DG-1210, refraktometrický detektor RIDK 102, Ecom, Česká Republika
Kolona pro HPLC: Rezex ROA – organic acid H 300x7,8 mm LC-column
UV/VIS Spektrofotometr Helios (Thermo Spectronic, USA)
Třepačka, Orbital shaker – Incubator ES 20 (Biosan, Litva)
Papírové filtry, Buchnerova nálevka, očkovací box, vodní vývěva, laboratorní sklo

Mikroorganismus

Gluconacetobacter xylinum CCM 3611 – Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

3.2 Použité metody

Příprava extraktu z hroznových výlisků

Extrakt ze zamražených hroznových výlisků (zbavených jadérek a třapin, Obrázek P 1) byl připraven enzymatickou hydrolýzou pomocí enzymu Viscozyme. Zmražené výlisky byly po rozmražení vysušeny na lyofilizátoru (Obrázek P 2), a poté luhovány 4 hodiny ve vodě při laboratorní teplotě, následně byly rozmixovány. Vzniklá kašovitá hmota byla po přidání 1 % Viscozymu (přepočítáno na hmotnost výlisků) ponechána 24 hodin na třepačce za uvedených podmínek: 37 °C a 150 rpm. Poté byla tato hmota přefiltrována přes Buchnerovu nálevku (Obrázek P 4). Výsledný extrakt (Obrázek P 3) měl pH 4,2, a před stanovením obsahu redukujících cukrů bylo pH upraveno na hodnotu 7,0.

Stanovení celkového obsahu redukujících cukrů

Pro stanovení redukujících cukrů byly použity 3 metody – 1) metoda podle Somogyi-Nelsona (NS), 2) metoda pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS) a 3) HPLC stanovení pomocí standardů. Získané hodnoty koncentrace redukujících cukrů byly poté vyhodnoceny pomocí statistické metody ANOVA za využití programu Origin 8.

1) Metoda podle Somogyi-Nelsona

Principem této metody je redukce měďnatých iontů (Cu^{2+}) na měďné ionty (Cu^+). Tato změna se stanovuje kolorimetricky, původně světle modrá barva se změní na tmavě modrou barvu. Pro toto stanovení byly připraveny výchozí roztoky I, II a III podle následující tabulky (Tabulka 1). K 1 ml vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Roztok ve zkumavkách byl promíchán a 10 minut povařen. Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml roztoku III a vzniklá sraženina Cu_2O byla promícháním rozpuštěna. Následně byl roztok doplněn na 10 ml destilovanou vodou. Po promíchání byla změřena absorbance při 720 nm na UV/VIS spektrofotometru Helios. Jako slepý vzorek byla místo vzorku použita destilovaná voda a postup byl zcela totožný. Pomocí tohoto postupu byla změřena kalibrační křivka (Tabulka P 1, Obrázek P 5), kde jako redukující cukr vystupovala glukóza o koncentracích 0,1 – 1 mg/ml.

Tabulka 1 – Roztoky pro metodu podle Nelsona a Somogyiho

Roztok I	
Chemikálie	Množství [g]
Na ₂ CO ₃ bezvodý	12
NaHCO ₃	8
Na ₂ SO ₄ bezvodý	72
Vínan sodno-draselný	6
Dest. voda	400
Roztok II	
Chemikálie	Množství [g]
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	4
Na ₂ SO ₄	24
Dest. voda	200
Roztok III	
Chemikálie	Množství [g]
Molybdenan amonný	25
konc. H ₂ SO ₄	21
Na ₂ HAsO ₄ . 7 H ₂ O	3
Dest. voda	475

2) Metoda DNS

Principem DNS metody je redukce 3,5-dinitrosalicylové kyseliny vlivem D-glukózy na 3-amino-5-nitrosalicylát. Změna se projeví kolorimetricky, původně žlutá barva se změní na tmavě oranžovou barvu. Postup byl následovný. Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku a bylo k němu přidáno 0,5 ml DNS činidla. Vzorky byly následně 10 minut inkubovány při 70°C. Po ochlazení bylo přidáno 10 ml destilované vody, roztok byl promíchán a byla změřena absorbance při 540 nm. Jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda. Pomocí tohoto postupu byla změřena kalibrační křivka (Tabulka P 2, Obrázek P 6), kde jako redukující cukr vystupovala glukóza o koncentracích 0,1 – 1 g/l.

3) Stanovení redukujících cukrů pomocí HPLC

Připravený extrakt z hroznových výlisků byl neutralizován a 100krát zředěn, poté byl analyzován pomocí HPLC. Koncentrace jednotlivých cukrů v extraktu byla určena s pomocí připravených kalibračních závislostí glukózy (Tabulka P 3, Obrázek P 7) a fruktózy (Tabulka P 3, Obrázek P 8).

Stanovení celkových polyfenolů

Principem metody je reakce polyfenolů s Folin-Ciocalteovým činidlem, kde je aktivita reakce úměrná koncentraci hydroxylových skupin přítomných na aromatickém jádře, které ovlivňují redukční potenciál na molekule látky. Do zkumavky byl napipetován 1 ml zředěného Folin-Ciocalteova činidla (1:9 destilovaná voda) a 1 ml destilované vody. K tomuto roztoku bylo přidáno 100 µl vzorku a roztok byl promíchán. Roztok se nechal 5 minut stát při laboratorní teplotě. Poté k němu byl přidán 1 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃ a roztok byl opět promíchán. Vzniklý roztok se nechal stát 15 minut

při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 750 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 100 µl destilované vody. [21] Kalibrační závislost byla sestrojena s pomocí kyseliny gallové (Obrázek P 9) o koncentracích 0,1-0,35 g/l.

Stanovení celkových flavonoidů

Principem metody je tvorba komplexů C-4 keto skupiny a C-3 anebo C-5 hydroxylové skupiny flavonů a flavonolů po přidání chloridu hlinitého, stabilních v kyselém prostředí. Přičemž chlorid hlinitý tvoří komplexy s *ortho*-dihydroxylovými skupinami v α - anebo β - kruhu flavonoidů a tyto komplexy jsou labilní v kyselém prostředí. [22] Postup byl následovný: do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml NaNO₂. Takto vzniklý roztok byl promíchán a ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 0,2 ml AlCl₃ a roztok byl znovu promíchán a ponechán 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 1,5 ml NaOH a 1 ml destilované vody. Po promíchání byl vzorek ponechán 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při 510 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 0,5 ml destilované vody. Kalibrační závislost byla sestrojena pomocí katechinu (Obrázek P 10) o koncentracích 0,05-0,3 g/l.

Stanovení titrační kyselosti hroznového extraktu

Množství organických kyselin v hroznovém extraktu bylo stanoveno pomocí titrace standardním roztokem hydroxidu sodného (pH = 8,1). Nejdříve byla provedena standardizace roztoku NaOH pomocí roztoku dihydrátu kyseliny šťavelové. Standardizace byla provedena titračně s vizuální indikací pomocí barviva fenolftalein.

Při samotném stanovení bylo do kádinky napipetováno 25 ml vzorku a následně byla za stálého míchání provedena titrace NaOH do hodnoty pH rovné 8,1. Byl odečten první objem. K roztoku bylo následně přidáno 10 ml roztoku formaldehydu a nechal se 1 minutu odstát. Poté byla opět provedena titrace NaOH do stejného pH a byl odečten druhý objem. [23]

Stanovení obsahu vitamínu C

Nejdříve byla provedena standardizace roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu. K 1 ml standardního roztoku kyseliny askorbové (100 mg rozpuštěno ve 100 ml odměrné baňce v kyselině monohydrogenfosforečné) bylo přidáno 10 ml 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné a titruje se odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu do růžového zbarvení.

Při stanovení bylo 10 ml vzorku napipetováno do titrační baňky a bylo k němu přidáno 10 ml 2% kyseliny monohydrogenfosforečné. Následně byla třikrát provedena titrace a výsledek byl zprůměrován. [23]

Kultivace bakterií a optimalizace podmínek

Kultivace probíhala v 500 ml Erlenmeyerových baňkách a objem média byl 100 ml. Bakterie byla kultivována submerzně na sacharidovém médiu o koncentraci 20 g/l (Tabulka 3) za stálého třepání (130 rpm) a paralelně staticky při teplotě 30°C. Kultivace zahrnovala 2 stupně: nejprve kultivaci na pevném médiu na agarových miskách, poté byly buňky přeočkovány do produkčního média. Dynamická kultivace probíhala vždy 7 dnů a statická (Obrázek P 11) 15 dní.

Tabulka 2 – Složení pevného média na agarové misky (podle doporučení České sbírky mikroorganismů)

Chemikálie	Hmotnost (g)
Glukóza	100
Uhličitan vápenatý	20
Kvasničný extrakt	10
Agar	17
Destilovaná voda	1000

Tabulka 3 – Složení produkčního média [6]

Chemikálie	Hmotnost (g)
Sacharid*	20
Pepton	5
Kvasničný extrakt	5
Kyselina citronová	0,115
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	0,27
Destilovaná voda	1000

*Glukóza, fruktóza, sacharóza, manóza, galaktóza, kombinace glukóza-fruktóza

Produkce bakteriální celulózy se optimalizovala z hlediska použitého uhlíkového zdroje (glukóza, fruktóza, sacharóza, manóza, galaktóza a kombinace glukóza-fruktóza a cukr z extraktu), použitého pH média (6,6; 5,6; 5,1) a typu kultivace (dynamická, statická).

Čištění vyprodukované bakteriální celulózy

Bakteriální celulóza byla čištěna nejdříve 15minutovým luhováním v ethanolu. Poté byla čištěna 15 minut v horké vodě. Některé vzorky byly pro další analýzu čištěny povařením v 0,1 M NaOH po dobu 20 minut.

Morfologie stanovená rastrovacím elektronovým mikroskopem (REM)

Morfologie byla stanovena rastrovacím elektronovým mikroskopem při použití vzdálenosti 6-7 mm a při 2 kV. Jako detektor byl použit SE detektor (VEGA, Tescan). Z morfologie je možné pozorovat rozdílnou strukturu v závislosti na použitém sacharidu, a to hlavně z pohledu čištění vzorku. V nepřečištěných vzorcích je vidět velké množství bakterií, které navíc obsahují i proteiny.

Stanovení molekulové hmotnosti bakteriální celulózy

Vzorky pro tuto analýzu byly připraveny následujícím způsobem. Nejprve bylo 50 mg vzorku bakteriální celulózy 24 hodin třepáno ve 2 ml ethanolu. Následovala výměna rozpouštědla, kdy byl ethanol vyměněn za dimethylacetamid. V tomto roztoku byl vzorek opět protřepáván a tento krok byl dvakrát opakován. Poté byly vzorky umístěny do vialky s 1,5 ml 9% roztoku dimethylacetamidu a chloridu lithného. V tomto roztoku byly vzorky po dobu 72 hodin rozpouštěny. Před zavedením vzorku do kolony byly vzorky naředěny 1:10 a přefiltrovány přes filtr s velikostní pórů 0,2 μm . Jako eluent byl použit výše zmíněný roztok 9% dimethylacetamidu a chloridu lithného.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Porovnání dvou spektrofotometrických metod pro detekci redukujících cukrů ve vzorku extraktu z hroznových výlisků

Spektrofotometrické stanovení redukujících cukrů patří k rychlejším a jednodušším stanovením z časového a přístrojového hlediska než například HPLC. Hlavním principem spektrofotometrických metod je stanovení obsahu barevných komplexů, které vznikají při reakci redukujících cukrů. Množství těchto cukrů se pak stanovuje s využitím kalibračních křivek. V této bakalářské práci byla pro kalibrační křivky použita D-glukóza. Cílem této práce bylo zjistit, která z těchto dvou metod (SN, DNS) je vhodnější pro určení koncentrace redukujících cukrů přítomných v extraktu z hroznových výlisků. Nejpresnější je samozřejmě metoda HPLC, ale ta je časově a přístrojově náročná, proto byla použita spíše pro upřesnění a potvrzení výsledků získaných pomocí SN a DNS.

Pomocí zjištěných kalibračních závislostí byla koncentrace redukujících cukrů v extraktu z hroznových výlisků stanovena pomocí metody Somogyi-Nelsona na 38,04 g/l (Tabulka 4) a pomocí DNS na 41,56 g/l (Tabulka 5). Ve víně se obsah sacharidů dle literatury uvádí ve velmi velkém rozptylu z důvodu rozlišnosti druhů.

Už na pohled je patrný rozdíl mezi výsledky těchto metod. Tento výsledek byl očekávaný, jelikož byl pozorován už dříve. V dřívějších studiích [24] bylo zjištěno, že DNS metoda má až desetkrát menší citlivost než metoda Somogyi-Nelsona a zároveň není schopná detekovat oligosacharidy. Dále také vykazuje vyšší koncentrace redukujících sacharidů, než je skutečný počet hemiacetalových skupin ve studovaném vzorku. Tato metoda je také rychlejší díky použití jediného činidla.

Při přípravě kalibračních křivek, které byly připraveny ve stejném rozsahu 0,1-1,0 g/l glukózy, bylo pozorováno, že metoda Somogyi-Nelsona u koncentrace 0,8 g/l dosáhla svého detekčního limitu. To znamená, že pokud by byla koncentrace ve studovaném vzorku 0,8 g/l a vyšší, nebylo by možné stanovit přesnou koncentraci redukujících sacharidů. Metoda DNS ve stejném rozsahu byla schopna určit koncentrace až na maximální připravenou hranici 1,0 g/l. Metoda Somogyi-Nelsona se tedy hodí pro nižší koncentrace stanovovaných sacharidů. Pokud tedy vzorek obsahuje vyšší koncentraci sacharidů, je nutné vzorek adekvátně naředit.

Naměřené hodnoty pro přípravu kalibračních křivek byly podrobeny analýze statistickou metodou ANOVA, která určila hodnoty, které byly příliš vzdálené. Tím pádem tyto hodnoty nebyly dále používány pro sestavení kalibračních závislostí.

Ve stanovovaném vzorku extraktu z hroznových výlisků (100 g) byl pomocí DNS stanoven 1,09krát vyšší obsah redukujících sacharidů než pomocí SN. Obě tyto metody poskytly větší hodnoty obsahu redukujících cukrů než HPLC. Pomocí HPLC byl obsah cukrů stanoven na 31,64 g/l (Tabulka 6), pomocí SN na 38,04 g/l (Tabulka 4) a pomocí DNS na 41,56 g/l (Tabulka 5). Metoda SN tedy obsah redukujících cukrů nadhodnocuje 1,2krát, zatímco metoda DNS 1,3krát. Pokud není potřeba použití těchto výsledků pro přesné stanovení, lze použít obě tyto metody, které poskytnou srovnatelný výsledek. Pokud by však bylo nutné pro další práci potřebné znát přesný obsah redukujících sacharidů, je lepší použít metodu SN, jejíž hodnoty jsou bližší skutečnému obsahu cukrů ve vzorku, ale stále je nutné mít na vědomí nadhodnocení obsahu cukrů. Toto nadhodnocení je dáno větší citlivostí HPLC a odchylky také vzniknou při ředění.

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty absorbancí metodou SN pro zředěný extrakt z výlisků (100 g) a vypočtené koncentrace redukujících cukrů

Vzorek SN	A (-)			Průměr naměřených absorbancí (-)	c (g/l)
1. série	0,757	0,761	-	0,759	0,7028
2. série	0,720	0,716	0,720	0,719	0,6627
3. série	0,733	0,736	0,740	0,736	0,6802

Tabulka 5 – Naměřené hodnoty absorbancí metodou DNS pro zředěný extrakt z výlisků (100 g) a vypočtené koncentrace redukujících cukrů

Vzorek DNS	A (-)			Průměr naměřených absorbancí (-)	c (g/l)
1. série	0,138	0,141	0,140	0,140	0,7137
2. série	0,149	0,152	0,152	0,151	0,7708

4.2 Charakterizace extraktu z hroznových výlisků

Extrakt z hroznových výlisků (100 gramů) obsahoval směs redukujících cukrů. Extrakt měl tmavě žlutou barvu. Toto zabarvení bylo způsobeno hlavně přítomnými polyfenoly a flavonoidy. Obsah polyfenolů byl stanoven na 1,448 g/l a obsah flavonoidů na 0,0313 g/l. Co se cukrů týče, typ a jejich koncentrace byly stanoveny pomocí metody HPLC. Obsah glukózy byl stanoven na 13,64 g/l a obsah fruktózy na 18,004 g/l (Tabulka 6).

Tabulka 6 – Naměřené hodnoty metodou HPLC pro extrakt z výlisků (100 g) a vypočtené koncentrace redukujících cukrů

Glukóza			
	Max. píku (min)	Plocha píku	Koncentrace (g/l)
Vzorek	11,472	2,0686	13,64
Fruktóza			
Vzorek	12,43	2,0243	18,004

Hodnota pH extraktu byla stanovena na 4,2 a kyselost byla titrační metodou stanovena na 1,525 g/l.

Pomocí standardizace odměrného roztoku a následného výpočtu z titračního stanovení byl stanoven obsah vitamínu C na 435 mg/l.

4.3 Optimalizace produkce bakteriální celulózy

Při optimalizaci produkčního média bylo zjištěno, že nejvíce bakteriální celulózy se produkuje při výchozím pH média, což je okolo hodnoty 6,6. Při nižším pH docházelo k jasnému snižování produkce bakteriální celulózy (Tabulka 7). Teplota produkce nebyla měněná, bylo použité teplotní optimum 30 °C.

Tabulka 7 – Optimalizace produkce bakteriální celulózy z hlediska pH (použita glukóza 20 g/l)

Vzorek	Protokolové číslo	Hmostnost BC (mg) ze 100 ml média	pH	Typ kultivace
BC1	RS 9	34,6	6,6	Dynamická
BC2	RS 10	16,1	5,6	Dynamická
BC3	RS 11	15,3	5,2	Dynamická
BC4	RS 12	555	6,6	Statická
BC5	RS 13	448	5,6	Statická
BC6	RS 14	410	5,2	Statická

Po optimalizovaném pH bylo zjišťováno, který sacharid vyhovuje bakterii nejvíce. Bylo zjištěno, že pro dynamickou produkci je nejvhodnější manóza (Tabulka 8, Obrázek P 12) a pro statickou sacharóza (Tabulka 9, Obrázek P 13).

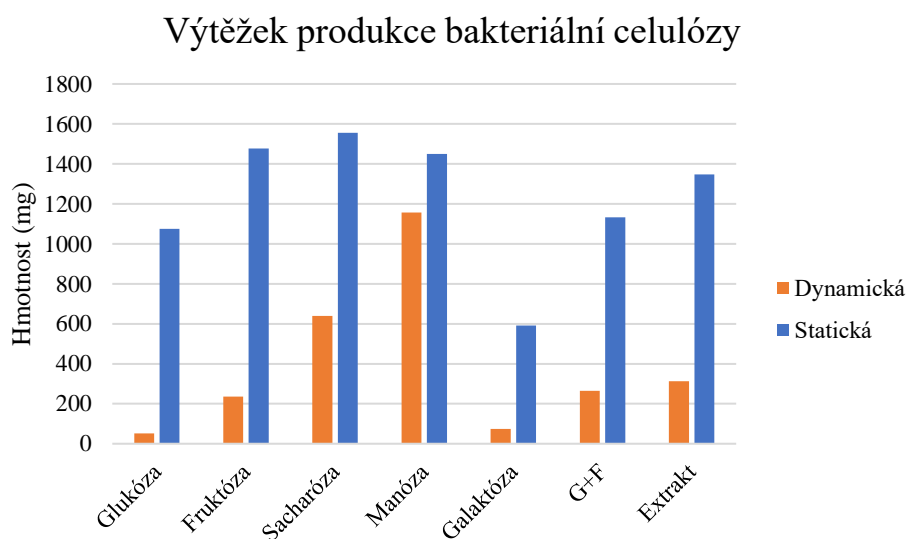
Tabulka 8 – Výtěžky dynamické produkce bakteriální celulózy

Vzorek	Protokolové číslo	Hmostnost BC (mg) ze 100 ml média	Zdroj uhlíku (20 g/l)
BC7	RS 5	31,8	Glukóza
BC8	RS 6	42,8	Glukóza
BC9	RS 7	51,2	Glukóza
BC10	RS 16	3,2	Galaktóza
BC11	RS 17	2,6	Glukóza
BC12	RS 18	5,8	Manóza
BC13	RS 19	2,3	Fruktóza
BC14	RS 20	41,8	Glukóza
BC15	RS 24	9,2	Fruktóza
BC16	RS 25	2,3	Glukóza+Fruktóza (1:1)
BC17	RS 26	18,1	Glukóza
BC18	RS 29	350	Glukóza
BC19	RS 30	157	Glukóza
BC20	RS 33	640	Sacharóza
BC21	RS 36	74	Galaktóza
BC22	RS 37	1156	Manóza
BC23	RS 38	1029	Glukóza
BC24	RS 40	264	Glukóza+Fruktóza (1:1)
BC25	RS 41	236	Fruktóza
BC26	RS 46	836	Glukóza
BC27	RS 48	313	Extrakt
BC28	RS 49	253	Extrakt
BC29	RS 50	474	Glukóza

Tabulka 9 – Výtěžky statické produkce bakteriální celulózy

Vzorek	Protokolové číslo	Hmotnost BC (mg) ze 100 ml média	Zdroj uhlíku (20 g/l)
BC30	RS 21	15,6	Sacharóza
BC31	RS 22	1,6	Galaktóza
BC32	RS 23	352	Mannóza
BC33	RS 27	74,5	Glukóza+Fruktóza (1:1)
BC34	RS 28	1477	Fruktóza
BC35	RS 32	1450	Manóza
BC36	RS 34	1075	Glukóza
BC37	RS 42	1555	Sacharóza
BC38	RS 43	591	Galaktóza
BC39	RS 44	1077	Fruktóza
BC40	RS 45	1133	Glukóza+Fruktóza (1:1)
BC41	RS 52	267	Extrakt
BC42	RS 53	1348	Extrakt

Větší výtěžnosti bylo dosaženo při produkci statické (Obrázek 4).

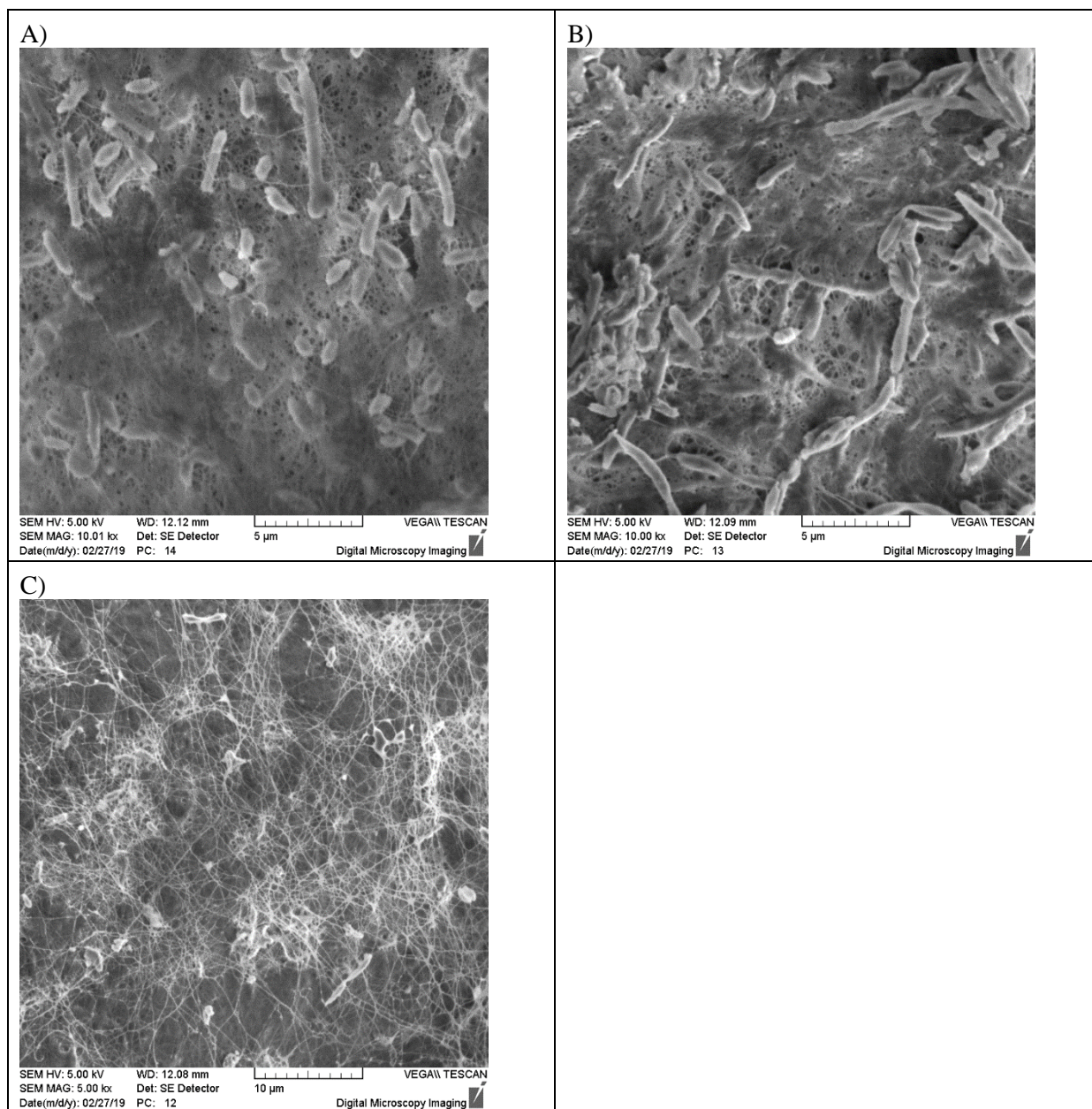


Obrázek 4 – Srovnání výtěžků kultivace bakteriální celulózy dle užitého zdroje uhlíku

Produkce na industriálních sacharidech, co se týče směsi glukózy a fruktózy a na hroznovém extraktu se od sebe příliš lišily jen nepatrně v případě dynamické produkce. V případě statické produkce byl rozdíl větší. O něco vyšší výtěžky byly dosaženy za použití hroznového extraktu. V případě dynamické produkce byl tento rozdíl přibližně o 50 miligramů vyšší, v případě statické produkce se jednalo o rozdíl 200 mg ve prospěch extraktu z hroznových výlisků.

4.4 Charakterizace morfologie vybraných vzorků bakteriální celulózy

Morfologie vyprodukovaných vzorků bakteriální celulózy (čištěné roztokem NaOH nebo nečištěných vzorků) je zobrazená na Obrázek 5. Na částech obrázku A a B jsou jasně identifikovatelné jednotlivé buňky bakterie *Gluconacetobacter xylinus*. Část C zobrazuje samotnou strukturu bakteriální celulózy.



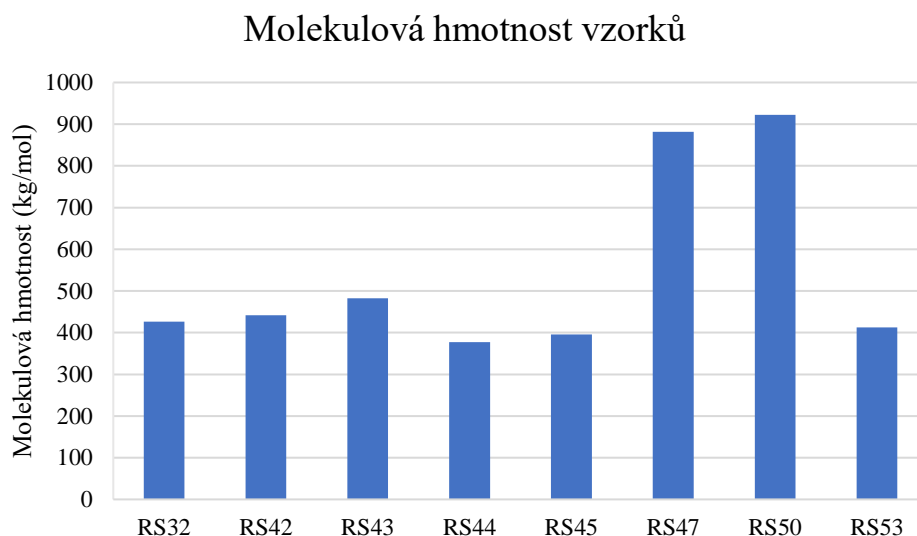
Obrázek 5 – Morfologie vybraných vzorků bakteriální celulózy A) RS29 – nečištěný vzorek, glukóza; B) RS33 – nečištěný vzorek, sacharóza; C) RS34 – čištěný vzorek pomocí NaOH, glukóza

4.5 Charakterizace produktu zjištěním molekulové hmotnosti bakteriální celulózy

Pro tuto analýzu byly vzorky vybrané tak, aby každý zdroj uhlíku měl své zastoupení. Tím pádem je možnost porovnat molekulovou hmotnost těchto produktů (Tabulka 10, Obrázek 6).

Tabulka 10 – Molekulová hmotnost jednotlivých vzorků

Vzorek	M (kg/mol)	Zdroj uhlíku (20 g/l)
RS32	426,1	Manóza
RS42	441,9	Sacharóza
RS43	482,5	Galaktóza
RS44	377,6	Fruktóza
RS45	396,0	Glukóza + Fruktóza (1:1)
RS50	922,6	Glukóza
RS53	412,9	Extrakt



Obrázek 6 – Molekulová hmotnost vybraných vzorků

Všechny zkoumané vzorky měly molekulovou hmotnost mezi 377,6-482,5 kg/mol. Jedinou výjimkou je vzorek produkovaný na glukóze. Tento vzorek měl molekulovou hmotnost 922,6 kg/mol. Tato molekulová hmotnost je přibližně o 129 % vyšší než průměrná hmotnost ostatních vzorků.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce je zjistit, jak dobře dokáže bakterie *Gluconacetobacter xylinus* – CCM 3611, získaná z české sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně, využít extrakt z hroznových výlisků pro produkci bakteriální celulózy.

Při pozorování produkce byl jasně pozorovatelný rozdíl mezi dynamickou a statickou produkcí. Typ produkce závisí na požadovaných vlastnostech produktu. Při statické se produkují filmy bakteriální celulózy, které by mohly mít využití jako krycí materiál ran. Při produkci dynamické dochází k produkci vláken celulózy.

Produkce také byla zkoumána z hlediska použitého zdroje uhlíku. Pro statickou produkci byla pozorována sacharóza jako nejlepší uhlíkový zdroj. Co se týče dynamické produkce, pro tu je nejvhodnějším substrátem manóza.

Dalším cílem bylo porovnání citlivosti a využitelnosti metod stanovení redukujících cukrů. Z provedených pokusů vychází, že účinnější je metoda DNS, která při vyšších koncentracích do 1 g/l nemá svůj limit detekce, zatímco metoda Somogyi-Nelson již při koncentraci 0,8 g/l dosahuje meze detekce. Přesnost těchto metod také byla srovnávána se stanovením pomocí HPLC. Porovnáním bylo zjištěno, že bližší hodnoty ke skutečné koncentraci poskytuje metoda Somogyi-Nelsona. U metody DNS byl tento rozdíl větší.

Pro vyprodukovanou bakteriální celulózu byla také stanovena molekulová hmotnost. Ta ukázala, že závisí na použitém zdroji uhlíku. Nejvyšší molekulovou hmotnost měl vzorek, který byl produkován za využití glukózy. Naopak nejmenší molekulovou hmotnost měl vzorek, který byl vyprodukován na fruktóze. Pomocí metody SEM byla potvrzena typická struktura bakteriální celulózy.

Tato práce tedy zjistila, že využití hroznových výlisků jako zdroje pro produkci bakteriální celulózy je možné. Dokonce v porovnání se směsí industriálních sacharidů dosahuje vyšších výtěžků.

6 ZDROJE

BIBLIOGRAFIE

- [1] BOONE, David, Richard CASTENHOLZ a George GARRITY. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2012. ISBN 978-0387-24145-6.
- [2] ESA, Faezah, Siti TASIRIN a Norliza RAHMAN. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2014, **2**, 113-119. DOI: 10.1016/j.aaspro.2014.11.017. ISSN 22107843. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210784314000187>
- [3] SHODA, Makoto a Yasushi SUGANO. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2005, **10**(1), 1-8. DOI: 10.1007/BF02931175. ISSN 1226-8372. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02931175>
- [4] LIN, Shin-Ping, Iris LOIRA CALVAR, Jeffrey CATCHMARK, Je-Ruei LIU, Ali DEMIRCI a Kuan-Chen CHENG. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*. 2013, **20**(5), 2191-2219. DOI: 10.1007/s10570-013-9994-3. ISSN 0969-0239. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10570-013-9994-3>
- [5] COSTA, Andrea, Fabíola ALMEIDA, Glória VINHAS a Leonie SARUBBO. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **8**. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02027. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02027/full>
- [6] ZHAO, Hongwei, Jian XIA, Jiming WANG, Xiaofei YAN, Cong WANG, Tingzhou LEI, Mo XIAN a Haibo ZHANG. *Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources*. 2017, **32**(2), 350-356. DOI: 10.1080/13102818.2017.1418673. ISSN 1310-2818. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2017.1418673>
- [7] PETERSEN, Nathan a Paul GATENHOLM. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, **91**(5), 1277-1286. DOI: 10.1007/s00253-011-3432-y. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3432-y>
- [8] ESGUERRA, Maricris, Helen FINK, Matthias LASCHKE, Anders JEPPSSON, Dick DELBRO, Paul GATENHOLM, Michael MENDER a Bo RISBERG. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009, **9999**, -. DOI: 10.1002/jbm.a.32516. ISSN 15493296. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.32516>

- [9] BODIN, Aase, Henrik BÄCKDAHL, Helen FINK, Lena GUSTAFSSON, Bo RISBERG a Paul GATENHOLM. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, **97**(2), 425-434. DOI: 10.1002/bit.21314. ISSN 00063592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.21314>
- [10] NIYAZBEKOVA, Zh.T., G.Zh. NAGMETOVA a A.A. KURMANBAYEV. AN OVERVIEW OF BACTERIAL CELLULOSE APPLICATIONS. *Biotechnology. Theory and practice*. 2018. DOI: 10.11134/btp.2.2018.3. ISSN 10289399. Dostupné také z: <http://www.biotechlink.org/2-2018/article3>
- [11] TROVATTI, Eliane, Carmen FREIRE, Pedro PINTO, Isabel ALMEIDA, Paulo COSTA, Armando SILVESTRE, Carlos NETO a Catarina ROSADO. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, **435**(1), 83-87. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.002. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312000063>
- [12] SASKA, S., H. BARUD, A. GASPAR, R. MARCHETTO, S. RIBEIRO a Y. MESSADDEQ. Bacterial Cellulose-Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration. *International Journal of Biomaterials*. 2011, **2011**, 1-8. DOI: 10.1155/2011/175362. ISSN 1687-8787. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ijbm/2011/175362/>
- [13] *COSMETIC BIO-CELLULOSE MASK PACK SHEET AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME*. b.r. Uděleno 2013.
- [14] SANTOS, Sara, José CARBAJO, Nuria GÓMEZ, Ester QUINTANA, Miguel LADERO, Arsenio SÁNCHEZ, Gary CHINGA-CARRASCO a Juan VILLAR. Use of bacterial cellulose in degraded paper restoration. Part I: application on model papers. *Journal of Materials Science*. 2016, **51**(3), 1541-1552. DOI: 10.1007/s10853-015-9476-0. ISSN 0022-2461. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10853-015-9476-0>
- [15] OKIYAMA, Atsushi, Masao MOTOKI a Shigeru YAMANAKA. Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. *Food Hydrocolloids*. 1993, **6**(6), 503-511. DOI: 10.1016/S0268-005X(09)80074-X. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X0980074X>
- [16] *Kabelky a bakterie. Česka vyvinula biomateriál z kokosové vody, připomíná kůži* [online]. b.r. [cit. 2019-05-20]. Dostupné z: https://www.lidovky.cz/relax/design/kabelky-a-bakterie-ceska-vyvinula-biomaterial-z-kokosove-vody.A180418_110027_In-bydleni_ape
- [17] WANG, Wei, Tai-Ji ZHANG, De-Wen ZHANG, Hong-Yi LI, Yu-Rong MA, Li-Min QI, Ying-Lin ZHOU a Xin-Xiang ZHANG. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of heme proteins on gold nanoparticles-bacteria cellulose nanofibers nanocomposite. *Talanta*. 2011, **84**(1), 71-77. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.12.015. ISSN 00399140. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914010009951>

- [18] VITTA, Satish, Marc DRILLON a A. DERORY. Magnetically responsive bacterial cellulose: Synthesis and magnetic studies. *Journal of Applied Physics*. 2010, **108**(5). DOI: 10.1063/1.3476058. ISSN 0021-8979. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3476058>
- [19] SOMMER, Lumír. *Teoretické základy analytické chemie II*. 2., upr. a dopl. vyd. Brno: Vysoké učení technické, 1995. ISBN 80-214-0659-3.
- [20] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN 35-273-0165-8.
- [21] IVANA, Márová a Vránová DANA. *Praktikum z biochemie*. Brno, 2016.
- [22] BLAINSKI, Andressa, Gisely LOPES a João DE MELLO. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L. *Molecules*. 2013, **18**(6), 6852-6865. DOI: 10.3390/molecules18066852. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6852>
- [23] HRSTKA, Miroslav a Lenka SOMROVÁ. *Praktikum z analytické chemie potravin*. 2017. Brno, b.r.
- [24] GUSAKOV, Alexander, Elena KONDRATYEVA a Arkady SINITSYN. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2011, **2011**, 1-4. DOI: 10.1155/2011/283658. ISSN 1687-8760. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ijac/2011/283658/>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BC	Bakteriální celulóza
BC-HA	Kompozit bakteriální celulózy a hydroxyapatitu
SN	Metoda Somogyi-Nelsona
DNS	Metoda s využitím dinitrosalicylové kyseliny
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie

7 PŘÍLOHY

Tabulka P 1 – Kalibrační závislost pro SN

Glukóza	1. série			2. série			3.série		
c (g/L)	A1 (-)	A2 (-)	A3 (-)	A1 (-)	A2 (-)	A3 (-)	A1 (-)	A2 (-)	průměr A(-)
0,1	0,170	0,163	0,166	0,175	0,179	0,176	0,165	0,164	0,170
0,2	0,281	0,282	0,281	0,285	0,279	0,281	0,279	0,281	0,281
0,3	0,376	0,366	0,372	0,359	0,363	0,361	0,369	0,375	0,368
0,4	0,461	0,472	0,470	0,460	0,454	0,454	0,453	0,462	0,461
0,5	0,557	0,559	0,557	0,559	0,561	0,560	0,564	0,559	0,560
0,6	0,693	0,676	0,687	0,674	0,655	0,661	0,655	0,658	0,670
0,7	0,732	0,739	0,734	0,755	0,772	0,771	0,716	0,725	0,743
0,8	0,852	0,840	0,840	0,849	0,853	0,850	0,805	0,808	0,837
0,9	0,864	0,868	0,868	0,857	0,869	0,858	0,836	0,827	0,856
1,0	0,864	0,868	0,864	0,889	0,878	0,880	0,831	0,823	0,862

Tabulka P 2 – Kalibrační závislost pro DNS

Glukóza	1. série			2. série			3.série		
c (g/L)	A1 (-)	A2 (-)	A3 (-)	A1 (-)	A2 (-)	A3 (-)	A1 (-)	A2 (-)	průměr A(-)
0,1	0,022	0,019	0,022	0,015	0,016	0,015	0,019	0,020	0,019
0,2	0,033	0,044	0,036	0,042	0,040	0,042	0,032	0,041	0,039
0,3	0,062	0,062	0,062	0,064	0,071	0,068	0,055	0,059	0,063
0,4	0,077	0,083	0,080	0,073	0,074	0,073	0,075	0,078	0,077
0,5	0,093	0,098	0,094	0,106	0,106	0,011	0,093	0,097	0,087
0,6	0,116	0,109	0,109	0,119	0,114	0,117	0,109	0,109	0,113
0,7	0,133	0,137	0,136	0,138	0,148	0,140	0,124	0,138	0,137
0,8	0,154	0,152	0,152	0,161	0,159	0,161	0,151	0,145	0,154
0,9	0,180	0,183	0,181	0,182	0,184	0,183	0,173	0,174	0,180
1,0	0,192	0,189	0,190	0,195	0,199	0,198	0,221	0,226	0,201

Tabulka P 3 – Kalibrační závislost pro HPLC

Glukóza			Fruktóza		
c (g/l)	Max. píku t (min)	Plocha píku	c (g/l)	Max. píku t (min)	Plocha píku
0,5	11,478	3,502	0,1	12,425	0,6496
1	11,478	6,1779	0,2	12,428	1,2626
1,5	11,478	10,4158	0,3	12,430	1,8603
2,5	11,472	15,7911	0,4	12,428	2,5034
5	11,492	30,8642	0,5	12,430	3,1705



Obrázek P 1 – Hroznové výlisky



Obrázek P 2 – Sušení hroznových výlisků na lyofilizátoru

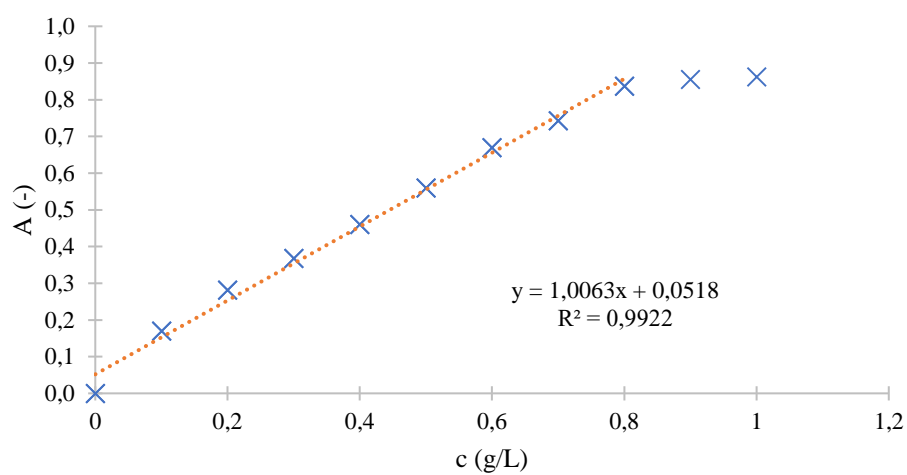


Obrázek P 4 – Filtrační aparatura



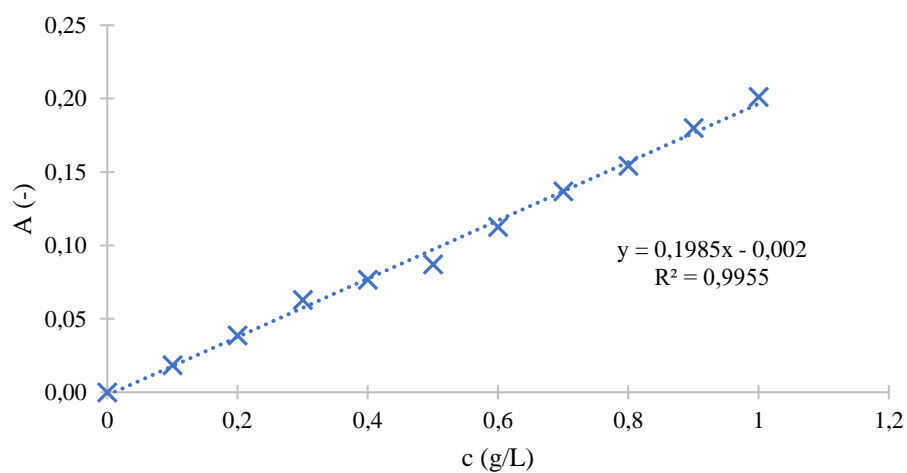
Obrázek P 3 – Extrakt z hroznových výlisků

Kalibrační závislost - Somogyi - Nelson



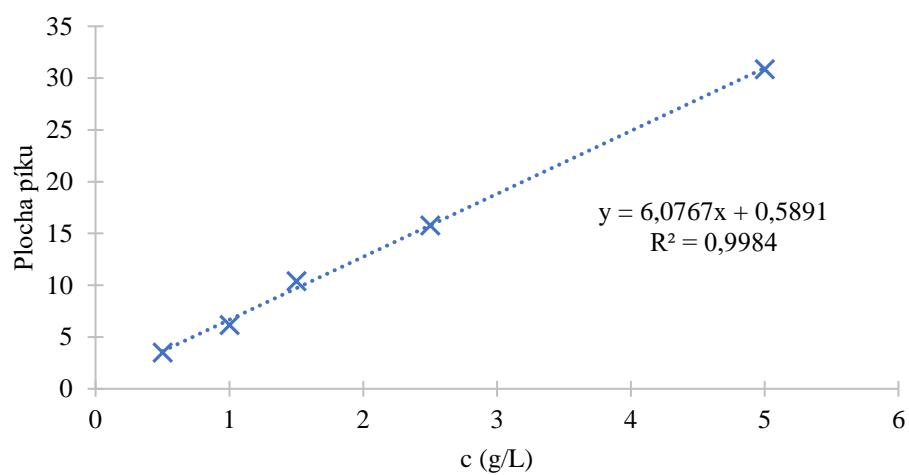
Obrázek P 5 – Kalibrační závislost pro metodu SN

Kalibrační závislost - DNS



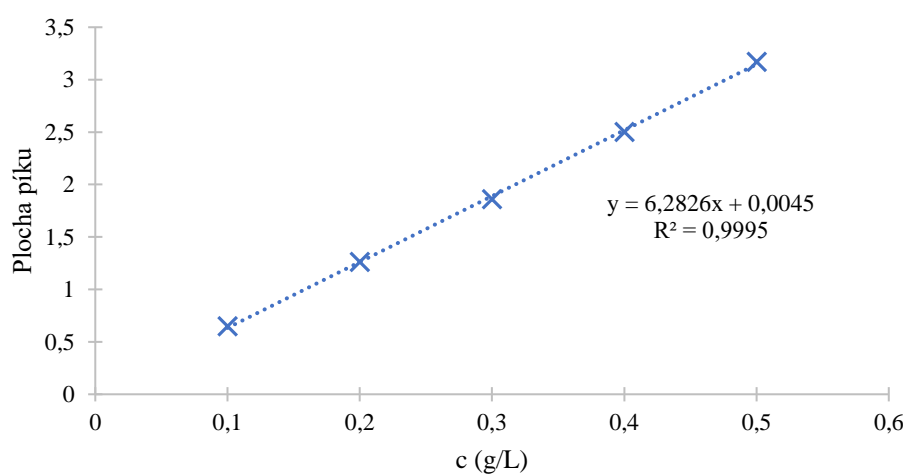
Obrázek P 6 – Kalibrační závislost pro metodu DNS

Kalibrační závislost pro HPLC - glukóza



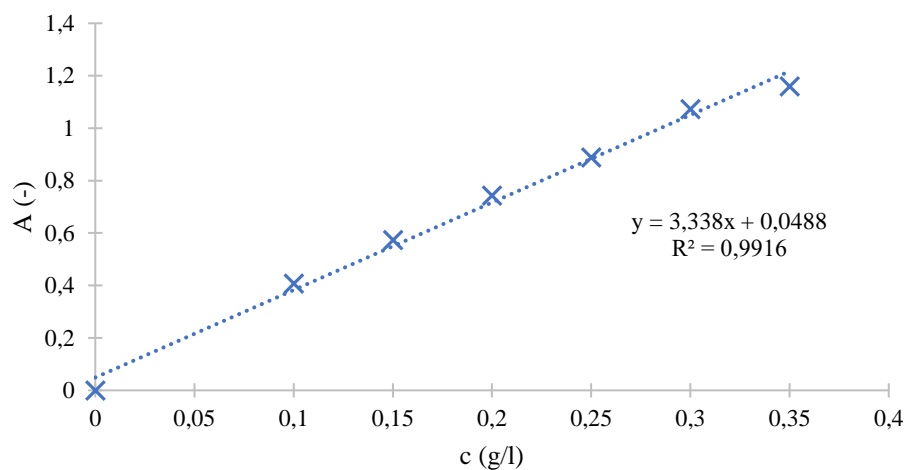
Obrázek P 7 – Kalibrační závislost pro HPLC – glukóza

Kalibrační závislost pro HPLC - fruktóza



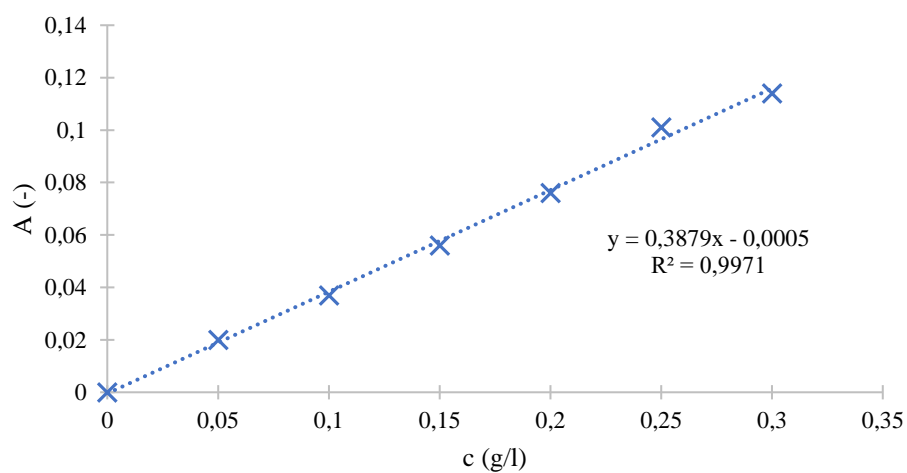
Obrázek P 8 – Kalibrační závislost pro HPLC – fruktóza

Kalibrační závislost - polyfenoly



Obrázek P 9 – Kalibrační závislost pro polyfenoly

Kalibrační závislost - flavonoidy



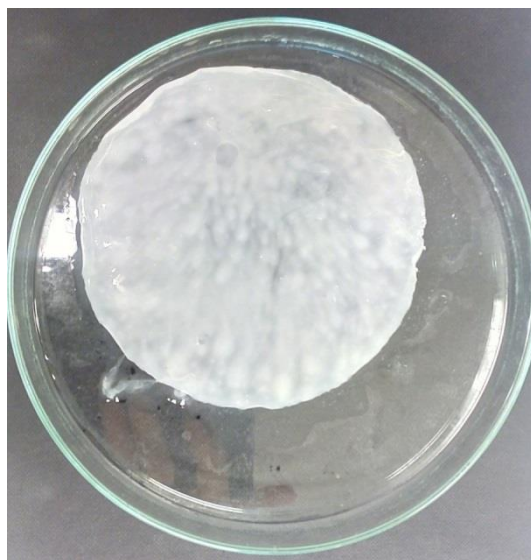
Obrázek P 10 – Kalibrační závislost pro flavonoidy



Obrázek P 11 – Statická produkce



Obrázek P 12 – Produkt dynamické produkce



Obrázek P 13 – Produkt ze statické produkce